

NASTAVNO - NAUČNOM VEĆU UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno - naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 23. 05. 2014. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Nada Kovačević (mentor), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Branislava Lakušić (mentor), vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. DMITAR Lakušić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet
4. Dr sc. Zoran Todorović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
5. Dr sc. Marina Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Varijabilnost sastava i biološka aktivnost etarskog ulja vrste *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae)**“, kandidata mr sc. Mirjane Marčetić, asistenta na Katedri za farmakognozu.

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno - naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mr sc. Mirjane Marčetić pod nazivom „**Varijabilnost sastava i biološka aktivnost etarskog ulja vrste *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae)**“, sastoji se od sledećih poglavlja: Rezime na srpskom i engleskom jeziku, Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključci, Literatura i Prilozi.

Disertacija je napisana na 178 strana i sadrži 70 slika (11 u Uvodu, 2 u Materijalu i metodama, 55 u Rezultatima i diskusiji i 2 u Prilozima), 34 tabela (4 u Uvodu, 4 u Materijalu i metodama, 8 u Rezultatima i diskusiji i 18 u Prilozima) i 205 literaturnih navoda. Prilozi su dati na dodatnih 68 strana.

U **Uvodu** su predstavljene informacije o porodici Apiaceae, rodu *Seseli* L. i biljnoj vrsti *Seseli rigidum* Waldst. & Kit.; opis roda i vrste i rasprostranjenje. U nastavku, dati su detaljni podaci o hemijskim karakteristikama, biosintezi i biološkoj aktivnosti sekundarnih metabolita zastupljenih u vrstama roda *Seseli*. Obradene su grupe metabolita koje predstavljaju isparljivu frakciju, odnosno sastojke koji se nalaze u izolatima dobijenim destilacijom biljnog materijala vodenom parom. Radi se o terpenskim sastojcima (etarskom ulju), poliketidnim sastojcima (poliacetilenima) i fenilpropanskim sastojcima iz grupe kumarina. U uvodnom delu predstavljeni su do sada poznati podaci o hemijskim sastojcima ispitivane biljne vrste, tradicionalnoj primeni i potvrđenoj biološkoj aktivnosti vrste *S. rigidum*, sa naročitim osvrtom na biološku aktivnost poliacetilena i falkarinola.

Cilj doktorske disertacije je jasno definisao nameru da se proveriti uticaj prirodnih faktora, kao što su karakteristike same biljne vrste *Seseli rigidum*, uticaj tipa staništa (klimatskih faktora i geoloških karakteristika podloge) i određenog lokaliteta na metaboličke aktivnosti, akumulaciju sekundarnih metabolita i biološku aktivnost izolata (etarskog ulja).

Poglavlje **Materijal i metode** sadrži sledeće delove: *Biljni materijal*, *Izolacija i hemijska analiza etarskog ulja*, *Statističke metode i Ispitivanje biološke aktivnosti etarskog ulja*.

U prvom delu *Biljni materijal* dati su podaci o odabranim tipovima staništa, lokalitetima i vremenskoj distribuciji uzimanja uzoraka u skladu sa fazama razvoja biljke. U nastavku taksativno su nabrojani uzorci biljnog materijala sa konkretnim podacima.

U drugom delu, *Izolacija i hemijska analiza etarskog ulja*, opisan je postupak pripreme izolata (etarskog ulja) u aparaturi po Clevenger-u. Takođe, definisani su uslovi gasnohromatografske analize (GC-FID i GC-MS analize), identifikacije sastojaka etarskog ulja i određivanje njihovog međusobnog odnosa.

U trećoj celini detaljno su naznačene *Statističke metode* sa informacijama o značaju metode za izvođenje određene vrste zaključaka, kao i podaci o materijalu na koji su analize primenjene. Za potrebe obrade podataka, u okviru ove disertacije, primenjene su sledeće

statističke metode: Osnovna statistika, Analiza varijanse (ANOVA), Analiza korelacije, Analiza glavnih komponenti (PCA analiza), Diskriminantna analiza (CDA analiza) i Klaster analiza. Sve statističke analize izvršene su korišćenjem programa Statistica 5.1.

U delu koji se odnosi na *Ispitivanje biološke aktivnosti etarskog ulja*, kandidat je jasno i precizno definisao principe, postupke, materijal i aparature sa kojom su urađena ispitivanja antimikrobne, antioksidantne, citotoksične i genotoksične aktivnosti etarskog ulja *S. rigidum* sa dva lokaliteta: Brđanska klisura i Golubac. U ovom delu teksta definisana su sledeća ispitivanja: Ispitivanje aktivnosti etarskog ulja na rast ATCC sojeva bakterija, Ispitivanje aktivnosti etarskog ulja na rast kliničkih izolata *Candida albicans*, Ispitivanje aktivnosti etarskog ulja na rast MRSA sojeva, Ispitivanje aktivnosti etarskog ulja na rast *Helicobacter pylori*, Ispitivanje citotoksične aktivnosti, Ispitivanje antioksidantne aktivnosti, Ispitivanje genotoksične i antigenotoksične aktivnosti.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije prikazani su i diskutovani u poglavlju **Rezultati i diskusija** na 93 stranice teksta sa 8 tabela i 55 slika. Ovo poglavlje dopunjeno je poglavljem **Prilozi** na 68 stranica sa 18 tabela i 2 slike. Kandidat je svoje rezultate detaljno uporedio sa odgovarajućim rezultatima drugih autora.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najznačajniji zaključci koji su doneti na osnovu rezultata eksperimentalnog rada.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (205) citiranih harvardskim stilom.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je biljna vrsta *Seseli rigidum* Waldst. & Kit., familija Apiaceae. Ova vrsta je široko rasprostranjena u Republici Srbiji i to na različitim tipovima staništa; naročito je značajno što raste na krečnjaku, ali i na serpentinskoj podlozi što nije tako uobičajeno.

Zbog toga je osnovni cilj ispitivanja bio da se utvrdi u kojoj meri se ostvaruje uticaj klimatskih uslova i tipa podloge na metaboličke procese i akumulaciju sekundarnih metabolita karakterističnih za vrste roda *Seseli*.

U drugom delu rada, urađen je skrining odabrane biološke aktivnosti; ovaj deo ispitivanja rađen je sa dva uzorka biljnog materijala koji su odabrani na osnovu rezultata dobijenih praćenjem varijabilnosti sastava i sadržaja sekundarnih metabolita.

Ispitana je intrapopulaciona i interpopulaciona varijabilnost sadržaja i sastava etarskog ulja biljne vrste *Seseli rigidum*. Uzorci biljnog materijala sakupljani su u različitim fazama razvoja biljke iz sedam populacija iz zapadne i istočne Srbije. Izabrani lokaliteti predstavljali su staništa koje karakteriše vlažna ili polusuva klima, krečnjačka ili serpentinitna podloga. Svaki uzorak je sakupljan kao individualni uzorak (po 10 pojedinačnih biljaka) i zbirni uzorak (po 5 celih biljaka). Etarsko ulje je izolovano primenom metode destilacije vodenom parom iz korena, herbe i ploda. Detaljna analiza etarskog ulja urađena je primenom GC i GC/MS metoda. Za obradu rezultata primenjene su sledeće statističke metode: analiza varijansi, analiza glavnih komponeneta, diskriminantna analiza, klaster analiza.

Ispitivanjem različitih biljnih organa individualnih uzoraka vrste *S. rigidum* sakupljenih sa različitih lokaliteta, utvrđeno je da koren sadrži 0,1-1,0 % etarskog ulja, herba 0,2-1,5% i plod 0,3-4,7% etarskog ulja.

Etarsko ulja 206 individualnih uzoraka vrste *S. rigidum* predstavlja smešu falkarinola (0-95,3%), sabinena (0-69,1%), α -pinena (0-65,6%), limonena (0-43,4%), β -felandrena (0-37,5%), germakrena B (0-33,3%), karotola (0-21,9%), germakrena D (0-19,9%), β -seskvifelandrena (0-19,7%) i drugih sastojaka zastupljenih u manjoj količini.

Analiza varijansi (ANOVA) je pokazala da se statistički značajne razlike u sadržaju i sastavu etarskog ulja javljaju između ulja korena, herbe i ploda, dok su znatno manje razlike zabeležene između ulja izolovanih iz biljaka koje su rasle u različitim klimatskim uslovima, na različitim geološkim podlogama i u različitim populacijama. U tom smislu, najveći značaj za ustanovljenu hemijsku diferencijaciju analiziranih ulja imali su delovi biljke iz kojih je destilisano etarsko ulje, dok su klima, geološka podloga, i sama pripadnost populaciji imali veoma mali uticaj na ustanovljenu diferencijaciju.

Utvrđeno je da falkarinol predstavlja dominantnu komponentu u etarskom ulju 68 individualnih uzoraka korena (29,4-95,3%). Pored ovog jedinjenja u ulju korena devesilja prisutni su: α -pinen (0-15,4%), δ -amorfen (0-12,6%), sabinen (0-11,4%), 3-butil-ftalid (0-11,3%) i β -seskvifelandren (0-10,5%). Poliacetilen falkarinol je bio glavna komponenta ulja

korena kod svih individua tako da se etarsko ulje korena devesilja može okarakterisati kao ulje falkarinol hemotipa (29,4-95,3%).

Količina etarskog ulja u korenu svih ispitivanih individualnih uzoraka sakupljenih iz sedam analiziranih populacija je bila ujednačena. Statistički značajne razlike u sastavu etarskog ulja korena uočene su između populacija koje rastu pod uticajem različite klime; između populacija sa različitim geoloških podloga utvrđene su manje razlike.

U etarskom ulju herbe 68 individualnih uzoraka bili su zastupljeni: α -pinen (2,5-65,6%), sabinen (0,7-61,9%), limonen (0-43,4%), β -felandren (0-20,4%), kariofilen oksid (0-11,6%), bornil acetat (0-11,2%) i drugi sastojci zastupljeni u manjoj količini. Sadržaj navedenih komponenti u etarskom ulju herbe individualnih uzoraka, veoma je varijabilan. Na osnovu ukupnog udela dva najzastupljenija sastojaka, ova ulja mogu se razvrstati u dva hemotipa: α -pinenski i α -pinen/sabinenski. Individue iz zapadne Srbije (Brđanska klisura, Ovčar Banja, Moravica) pripadala su α -pinenskom hemotipu, dok su sve individue iz istočne Srbije (Golubac, Gornjačka klisura, Grza), kao i one sa lokaliteta Maglič (zapadne Srbije) pripadale α -pinen/sabinenskom hemotipu.

Analiza varijansi pokazala je da je najveći uticaj na varijabilnost etarskog ulja herbe imala klima (polusuva klima istočne Srbije i vlažna klima zapadne Srbije), manji uticaj je imala pripadnost populaciji, a najmanji uticaj je ispoljila različita geološka podloga.

Karakteristiku etarskog ulja 70 individualnih uzoraka ploda predstavlja prisustvo sabinena (0-69,1%), α -pinena (0,8-55,7%), β -felandrena (0-37,5%), falkarinola (0-35,6%), germakrena B (0-33,3%), karotola (0-21,9%), germakrena D (0,6-19,9%), β -seskvifelandrena (0-19,7%), (*E*)-kariofilena (0-18,3%) i limonena (0-16,0%). Odnos ovih sastojaka etarskog ulja ploda je izraženo varijabilan, tako da su ova ulja okarakterisana kao kompleksan sabinen/ α -pinen/ β -felandren/falkarinol/ germakren B hemotip.

Najveći uticaj na varijabilnost sastava etarskog ulja ploda imala je različita klima, zatim različita geološka podloga i populacija.

Analiza glavnih komponenti (PCA) pokazala je potpunu diferenciranost etarskog ulja korena, herbe i ploda vrste *S. rigidum*. Slično kao i analiza varijansi (ANOVA) i ova analiza je pokazala da deo biljke iz koga je ulje izolovano ima mnogo veći značaj na ustanovljenu diferenciranost etarskih ulja od klimatskih faktora, geološke podloge na kojoj su rasle ispitivane biljke i pripadnosti određenoj populaciji.

Primenom analize glavnih komponenti (PCA) na sve uzorke etarskog ulja izolovane iz određenog organa, utvrđeno je da klima ima značajan uticaj na sastav etarskog ulja korena i

herbe, dok na sastav etarskog ulja ploda, pre svega, utiče tip podloge (serpentinit vs. krečnjak).

Diskriminantna analiza (CDA) je, takođe, potvrdila jasno definisan sastav etarskog ulja korena, herbe i ploda vrste *S. rigidum*. Dodatno, ova analiza je ukazala i na značajnu diferenciranost ulja devesilja iz zapadne Srbije u odnosu na ulja iz istočne Srbije. Ovakvi rezultati su dobijeni kako za biljku u celini, tako i na nivou etarskog ulja korena, herbe i ploda. Takođe, CDA analiza je potvrdila da klimatski uslovi (vlažna vs. polusuva klima) imaju veći značaj na hemijsku diferenciranost etarskog ulja devesilja, u odnosu na vrstu zemljišta ili pripadnost individua određenoj populaciji.

Ispitivanjem sezonskih promena sadržaja i sastava etarskog ulja individualnih uzoraka korena devesilja iz dve faze razvoja, utvrđeno je da je koren jedinki iz faze plodonošenja sadržao veću količinu etarskog ulja. Takođe, postojale su statistički značajne razlike u sastavu ulja korena u različitim fazama razvoja; razlike se nisu odražavale na sadržaj glavne komponente (falkarinola), ali su bile uočene značajne razlike u odnosima manje zastupljenih komponenti.

Posle detaljne analize individualnih uzoraka vrste *S. rigidum*, izvršeno je ispitivanje zbirnih uzoraka biljnog materijala. Sa aspekta potencijalne eksploatacije i korišćenja biljne vrste, veoma značajno je sagledati zbirni uzorak kao moguću biljnu sirovinu.

Ispitivanjem sezonskih promena sadržaja i sastava etarskog ulja dobijenog destilacijom korena i nadzemnog dela zbirnih uzoraka, uočene su slične tendencije promena sadržaja etarskog ulja u zavisnosti od geološke podloge. Nasuprot tome, koncentracija glavnih komponenti ulja korena falkarinola i *n*-oktanala varirala je različito na različitoj podlozi. U etarskom ulju nadzemnih delova postojale su veće sličnosti u sezonskom variranju glavnih komponenti: α -pinena, limonena i sabinena.

Upoređivanjem sastava etarskog ulja korena, herbe i ploda individualnih uzoraka i zbirnog uzorka primenom metoda analize glavnih komponenti (PCA) i diskriminantnom analizom (CDA) uočeno je da etarska ulja individualnih i zbirnih uzoraka imaju veoma sličan sastav. Ipak, analiza varijanse (ANOVA) je pokazala da između ulja izolovanih iz biljnog materijala, koji je uzrokovan na različit način (individualni vs. zbirni uzorak), postoje statistički značajne razlike u sadržaju i hemijskom sastavu. Značajne razlike su, većinom, uočene kod komponenti ulja koje su bile prisutne u malim koncentracijama. Klaster analiza je jasno istakla razlike u uljima individualnih i zbirnih uzoraka.

Nakon urađene intrapopulacione i interpopulacione analize varijabilnosti sadržaja i sastava etarskog ulja, odabrane su dve populacije sa dva različita tipa staništa: Brđanska klisura (vlažna klima, serpentinska podloga) i Golubac (polusuva klima, krečnjačka podloga). Ulje dobijeno destilacijom korena, herbe i ploda zbirnog uzorka sa obe populacije korišćeno je za skrining biološke aktivnosti.

Etarska ulja korena, herbe i ploda *S. rigidum* iz obe populacije inhibirala su rast laboratorijskih sojeva *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* u koncentracijama od 6,25 do više od 200 µg/ml. Najbolju antimikrobnu aktivnost ispoljilo je etarsko ulje korena populacije iz Brđanske klisure na Gram pozitivne bakterije: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* i *E. faecalis* (MIK 6,25-25 µg/ml). Izražena antimikrobna aktivnost ulja korena populacije iz Brđanske klisure se, verovatno, zasnivala na značajnom sadržaju falkarinola (89,8%).

Ispitana je aktivnost etarskog ulja korena, herbe i ploda na rast kliničkih izolata *Candida albicans*. Ispitivana ulja su inhibirala rast *C. albicans* u rasponu koncentracija od 50 do više od 200 µg/ml, a najbolje delovanje su pokazala etarska ulja korena sa oba lokaliteta.

Preliminarno je ispitana antimikrobna aktivnost etarskog ulja korena, pošto je pokazalo najbolje delovanje na Gram pozitivne bakterije, na rast izolovanih bolničkih MRSA sojeva i standardni laboratorijski MRSA soj. Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije su se kretale u opsegu od 6,25 do 50,0 µg/ml.

Ispitivan je efekat kombinovane primene ispitivanog etarskog ulja i antibiotika različitog mehanizmima delovanja, na rast osam izolovanih MRSA sojeva. Etarsko ulje korena je pokazalo sinergistički efekat sa sva tri ispitivana antibiotika (ceftriaksonom, ciprofloksacinom i gentamicinom) na rast bolničkih i vanbolničkih MRSA sojeva.

Etarsko ulje korena inhibiralo je rast Gram negativne bakterije *Helicobacter pylori*. Izraženije delovanje je postignuto sa etarskim uljem korena biljaka populacije iz Brđanske klisure (zona inhibicije $21 \pm 2,2$ mm).

Svi ispitivani uzorci etarskih ulja delovali su citotoksično na ATCC ćelijske linije: humanog karcinoma grlića materice HeLa, humanog karcinoma kolona LS174, humanog karcinoma pluća A549 i ćelijsku liniju humanih fetalnih plućnih fibroblasta MRC-5 ($IC_{50}=7,41-75,91$ µg/ml). Najbolje delovanje ostvareno je sa etarskim uljem korena (7,41-30,32 µg/ml); nisu uočene značajne razlike u aktivnosti etarskog ulja korena iz različitih populacija.

Analiziran je efekat etarskog ulja korena, herbe i ploda devesilja iz obe populacije na promene ćelijskog ciklusa HeLa, LS174 i A549 ćelija. Etarska ulja devesilja indukovala su akumulaciju ćelija u sub G1 fazi (HeLa i LS174 ćelije), što ukazuje na moguću indukciju apoptoze.

Ispitivana je antioksidantna aktivnost etarskog ulja korena, herbe i ploda. Ukupna redukciona sposobnost etarskog ulja korena i ulja ploda iz Golupca je bila niska (0,20-0,38 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$), dok ostala etarska ulja nisu pokazala redukcionu sposobnost. Takođe, sposobnost inhibicije DPPH radikala svih ispitivanih ulja je bila niska (SC_{50} 2,00-27,60 mg/ml).

Primenom Komet testa ispitano je genotoksično i antigenotoksično delovanje etarskog ulja korena, herbe i ploda. Sva ispitivana etarska ulja nisu ispoljila genotoksično delovanje. Međutim, etarska ulja korena (12,5-100 $\mu\text{g/ml}$), herbe (25-100 $\mu\text{g/ml}$) i ploda (25-100 $\mu\text{g/ml}$) delovala su protektivno na DNK oštećenja indukovana vodonik peroksidom u post-tretmanu. Pošto etarska ulja nisu delovala antigenotoksično u pretretmanu, a ispoljila su i slabu antioksidantnu aktivnost, može se pretpostaviti, da se protektivni efekat zasniva na stimulaciji DNK reparacije.

Sigurno je da su svi potvrđeni biološki efekti ispitivanih etarskih ulja, i naročito najaktivnijeg etarskog ulja korena, zasnovani na značajnom sadržaju falkarinola (etarsko ulje korena biljaka iz Brđanske klisure sadrži 89,8% ovog sastojka). Iz literature je dobro poznata izuzetna aktivnost ovog poliacetilena, ali i njegovo toksično delovanje.

Pored nesumljivog naučnog značaja rezultata dobijenih analizom etarskog ulja individualnih uzoraka vrste *S. rigidum* i otkrivanje fundamentalnih principa i postojanja pravilnosti u produkciji sekundarnih metabolita, podaci o zbirnom uzorku su važni zbog praktične mogućnosti primene ovih rezultata. Praktična strana dobijenih rezultata, može biti sagledana u ciljanom uticaju na metaboličke aktivnosti određenih taksona i produkciju kvalitetne i hemijski definisane biljne sirovine za medicinske potrebe.

Takođe, ono što predstavlja interesantan podatak urađenih ispitivanja je i dobra aktivnost u okviru ispitivanja antigenotoksičnog delovanja etarskog ulja ploda *S. rigidum* sa kombinacijom α -pinena i falkarinola (do 35,6%). Relativno dobri rezultati dobijeni primenom ovog etarskog ulja zaista mogu predstavljati osnov za detaljniju analizu aktivnosti i, potencijalno, mogućnosti njegove primene.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Poznata je činjenica da na biosintezu etarskog ulja utiče niz faktora. Sadržaj i sastav etarskog ulja zavise, pre svega, od genotipa vrste, ali i od različitih ekoloških faktora, kako biotičkih tako i abiotičkih (Hamilton i sar., 2001; Figueiredo i sar., 2008; Lakušić i sar., 2012).

Dobijeni rezultati, posle primene različitih statističkih metoda, ukazali su na činjenicu da različiti delovi biljke sadrže etarsko ulje različitog sastava nezavisno od lokaliteta. Poznato je da se, kod velikog broja biljaka, sastav etarskog ulja dobijenog iz različitih delova biljke međusobno razlikje; slična činjenica je potvrđena i za vrstu *S. rigidum* (Jabrane i sar., 2009; Maggi i sar., 2009, Ayoub i sar.; 2006; Capetanos i sar.; 2007, Marčetić i sar.; 2014).

Značajni podaci odnose se na sastojke, koji karakterišu etarska ulja dobijena iz različitih biljnih organa. U korenu je najviše zastupljen poliacetilen falkarinol, što i predstavlja karakteristiku ovog ulja. Iako su poliacetileni rasprostranjeni u predstavnicima familije Apiaceae i vrstama roda *Seseli* (Barrero i sar., 1994; Zong i sar. 2007; Vučković i sar., 2010), njihovo prisustvo u vrsti *S. rigidum* do sada nije utvrđeno.

Etarsko ulje herbe *S. rigidum* predstavlja smešu, uglavnom, terpenskih sastojaka; α -pinena (2,5-65,6%), sabinena (0,7-61,9%), limonena (0-43,4%), β -felandrena (0-20,4%), kariofilen oksida (0-11,6%) i bornil acetata (0-11,2%). Izvršeno je upoređivanje sastava dobijenih rezultata etarskog ulja herbe sa literaturnim podacima o ovoj vrsti kao i sa ostalim vrstama roda *Seseli*: *S. annuum* L., *S. tomentosum* Vis., *S. peucedanoides* (MB) Koso-Polj., *S. globiferum* Vis., *S. montanum* L. ssp. *tomasinii*., *S. tortuosum* L., *S. campestre* Besser, *S. libanotis* W.D.J. Koch i *S. buchtormense* W.D.J. Koch (Bader i sar., 2003; Kaya i sar., 2003; Habibi i sar., 2003; Bulatović i sar., 2006; Ozturk i Ercisli, 2006; Tkachev i sar., 2006; Šavikin-Fodulović i sar., 2006; Kaya i sar., 2010; Šiljegović i sar., 2011; Janačković i sar., 2011).

Etarsko ulje ploda *S. rigidum* predstavlja smešu monoterpenskih, seskviterpenskih sastojaka i poliacetilena: sabinena (0-69,1%), α -pinena (0,8-55,7%), β -felandrena (0-37,5%), falkarinola (0-35,6%), germakrena B (0-33,3%), karotola (0-21,9%), germakrena D (0,6-19,9%), β -seskvifelandrena (0-19,7%), (*E*)-kariofilena (0-18,3%) i limonena (0-16,0%). Dosadašnje istraživanje je obuhvatalo samo monoterpenske sastojke etarskog ulja ploda *S. rigidum*, dok seskviterpenska jedinjenja i poliacetileni nisu ispitivani

(Kuznjecova i sar., 1982). Na osnovu klaster analize može se uočiti različit sastav etarskog ulja ploda vrste *S. rigidum* od ostalih vrsta roda *Seseli*: *S. campestre*, *S. tortuosum*, *S. resinosum* Freyn & Sint, *S. petraeum* M. Bieb., *S. andronakii* Woron., *S. globiferum* i *S. montanum* ssp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz (Baser i sar., 2000; Dogan i sar., 2006; Tosun i sar., 2006; Stojković i sar., 2008; Gonçalves i sar., 2012).

Faza razvoja biljnog organa često utiče na količinu i sastav etarskog ulja. Praćenjem kvantitativnih promena isparljivih sekundarnih biljnih metabolita u sekretornim strukturama tokom različitih ontogenetskih faza biljnih organa, utvrđeno je da se ne mogu doneti generalni zaključci o njihovoj dinamici koji bi važili za sve vrste. Naime, kod nekih biljaka količina etarskog ulja se sa starenjem organa postepeno povećava (plod vrsta *Foeniculum vulgare* Mill., *Coriandrum sativum* L., *Anethum graveolens* L.) (Telci i sar., 2009; Ramezani i sar., 2009), dok se kod drugih celokupna količina sintetiše još dok je organ sasvim mlad (list vrsta *Salvia officinalis* L., *Majorana hortensis* Moench, *Ocimum sanctum* L., *Cymbopogon flexuosus* Stapf) (Figueiredo i sar., 2008). Veliki broj primera potvrđuje da se i sadržaj pojedinih sastojaka etarskih ulja menja tokom razvoja biljnih organa. Ova varijabilnost može imati ekonomski značaj, jer od nje zavisi kvalitet etarskog ulja lekovitih i začinskih biljaka, kao i biljaka čije je etarsko ulje industrijska sirovina (Figueiredo i sar., 2008; Sangwan i sar., 2001). Ispitivanjem individualnih uzoraka korena vrste *S. rigidum* iz dve faze razvoja, utvrđene su statistički značajne razlike u sadržaju i sastavu ulja korena u različitim fazama razvoja. Takođe, kod zbirnih uzoraka korena i nadzemnog dela devesilja u različitim ontogenetskim fazama postojalo je sezonsko variranje sadržaja glavnih komponenti.

O uticaju klimatskih faktora na količinu i sastav etarskog ulja, ima relativno malo literaturnih podataka, koji se uglavnom odnose na gajene biljke iz familije Apiaceae (Aprotosoie i sar., 2010) i pripadnike familije Lamiaceae (Figueiredo i sar. 2008; Lakušić i sar., 2012; Russo i sar., 2013; Usano-Aleman y i sar., 2014). Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju da klima na određenim staništima utiče na sastav etarskog ulja korena, herbe i ploda devesilja. Dominantan uticaj klime na sadržaj i sastav etarskog ulja individualnih uzoraka devesilja uočen je primenom analize varijanse i analize glavnih komponenti. Diskriminantna i klaster analiza jasno su ukazale na hemijsku diferencijaciju etarskog ulja populacija iz zapadne Srbije, koje rastu u uslovima vlažne klime i populacija iz istočne Srbije, pod uticajem polusuve klime.

Uticaj tipa geološke podloge na biosintezu i emisiju terpena je specifičan za svaku vrstu (Ormeño i sar., 2007; Ormeño i sar., 2008). Uočene su razlike u sadržaju i sastavu etarskog ulja lista *Cistus albidus* L. i *C. monspeliensis* L. (Cistaceae) (Robles i Garzino, 1998;

Robles i Garzino, 2000), kao i etarskog ulja lista i ploda *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) (Flamini i sar., 2004) zavisno od podloge. Vrsta *S. rigidum* je fakultativna serpentinofita, što znači da uspeva kako na krečnjačkoj tako i na serpentinitskoj podlozi (Dudić i sar., 2007). U serpentinitskom zemljištu koncentracija magnezijuma je visoka i postoji izuzetno nepovoljan odnos kalcijuma i magnezijuma. Takođe, osnovnih mineralnih elemenata, azota, kalijuma i fosfora ima u malim količinama, dok su za biljke toksični teški metali, hrom i nikal, prisutni u visokim koncentracijama (Ormeño i sar., 2007; Ormeño i sar., 2008). Uprkos nepovoljnim uslovima na serpentinitskoj podlozi u odnosu na krečnjak, uticaj različite podloge na sadržaj i sastav etarskog ulja individualnih uzoraka korena, herbe i ploda vrste *S. rigidum* je bio znatno manje izražen od uticaja klime.

Rezultati dobijeni skriningom biološke aktivnosti etarskog ulja korena, herbe i ploda iz dve populacije *S. rigidum*, ukazuju na veliki značaj poliacetilena falkarinola na ispoljenu antimikrobnu aktivnost. Najbolju antimikrobnu aktivnost ispoljilo je etarsko ulje korena populacije iz Brđanske klisure, koje je sadržalo skoro 90 % falkarinola. Ranija ispitivanja su pokazala, da falkarinol iz kore *Oplopanax horridus* Miq. (Araliaceae) inhibira rast bakterija: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* i *M. avium*, (Kobaisy i sar., 1997), dok je falkarinol iz korena *Levisticum officinale* Koch. (Apiaceae) ispoljavao antimikrobnu aktivnost na rast *M. fortuitum* i *M. aurum* (Schinkovitz i sar., 2008). Etarsko ulje korena devesilja ispoljilo je izraženu antimikrobnu aktivnost na Gram pozitivne bakterije: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* i *E. faecalis* (MIK 6,25-25 µg/ml). Ranija ispitivanja antimikrobnog delovanja etarskog ulja cvasti *S. rigidum* (Stojković i sar., 2009) i etarskih ulja drugih vrsta roda *Seseli* (*S. libanotis*, *S. montanum* subsp. *tommasinii*, *S. indicum*, *S. gummiiferum* subsp. *gummiiferum*, *S. gummiiferum* subsp. *corymbosum*, *S. resinosum* i *S. hartvigii* Parolly & Nordt) su pokazala slabiju aktivnost (Singh i sar., 2002; Tosun i sar., 2004; Skalicka-Wozniak i sar., 2010; Šiljegović i sar., 2011).

Etarska ulja korena, herbe i ploda *S. rigidum* inhibirala su rast kliničkih izolata *C. albicans* (MIK 50- >200 µg/ml). Delovanje etarskih ulja korena, herbe i ploda je bilo izraženije od ranije ispitivane antifungalne aktivnosti etarskog ulja cvasti vrste *S. rigidum* (Stojković i sar., 2009), etarskih ulja ploda *S. tortuosum* i *S. montanum* (Gonçalves i sar., 2012) i etarskog ulja herbe vrste *S. annuum* na različite sojeve gljivica (Milosavljević i sar., 2007).

Terapija bolničkih i vanbolničkih infekcija izazvanih meticilin rezistentnim *Staphylococcus aureus* (MRSA) sojevima predstavlja značajan problem u svakodnevnoj

kliničkoj praksi. MRSA obično dovodi do infekcija kože i infekcija respiratornog i urogenitalnog trakta, ali i do osteomijelitisa, endokarditisa i septicemije (Gibbons, 2008; Garau i sar., 2009; Skov i sar., 2012). Etarsko ulje korena devesilja populacije iz Brđanske klisure ispoljilo je antimikrobno delovanje na izolovane bolničke MRSA sojeve i standardni laboratorijski MRSA soj (MIK 6,25-50,0 µg/ml). Terpenski sastojci etarskih ulja karvakrol (MIK 15,25 mg/ml), eugenol (MIK 133,75 mg/ml), timol (MIK 30,15 mg/ml) i geraniol (MIK 55 mg/ml) inhibirali su rast laboratorijskog MRSA soja, dok karvon, citronelol, mentol, menton i mircen nisu ispoljili delovanje (Gallucci i sar., 2006). Mogu se uočiti znatno niže MIK vrednosti i izraženije delovanje etarskog ulja korena devesilja od komponenti etarskih ulja u navedenom ispitivanju.

Bakterije ostvaruju rezistenciju na antibakterijske agense putem nekoliko mehanizama. Kod MRSA sojeva prisutna je smanjena osetljivost na β-laktamske antibiotike usled izmenjenog ciljnog mesta njihovog vezivanja - penicilin vezujućeg proteina (PBP). MRSA sojevi sa *mecA* genom sadrže izmenjenu transpeptidazu PBP2a, što rezultuje smanjenim vezivanjem antibiotika i onemogućene inhibicije sinteze bakterijskog ćelijskog zida (Hemaiswarya i sar., 2008). Jedan od pristupa za prevazilaženje bakterijske rezistencije je primena kombinovane terapije. Primenom agenasa, koji deluju sinergistički značajno se smanjuju MIK vrednosti, a samim time i neželjena delovanja nastala usled visokih doza. Prirodni proizvodi, poput etarskih ulja su smeše velikog broja komponenti, koje ostvaruju delovanje na mnogobrojna ciljna mesta i smanjuju mogućnost nastanka bakterijske rezistencije (Ma i sar., 2009; Hemaiswarya i Doble, 2009; Wagner, 2011). Etarsko ulje korena devesilja je pokazalo sinergistički efekat sa sva tri ispitivana antibiotika: ceftriaksonom, ciprofloksacinom i gentamicinom na rast bolničkih i vanbolničkih MRSA sojeva. Ranija istraživanja su pokazala da komponenta etarskih ulja karvon deluje sinergistički sa penicilinom na rast laboratorijskog MRSA soja, dok je kod citronelola, eugenola, geraniola, mentola, mentona i mircena uočeno indiferentno delovanje. Interakcija između penicilina i timola, komponente etarskog ulja sa poznatim antimikrobnim delovanjem, je bila čak antagonistička (Gallucci i sar., 2006). Kod etarskog ulja listova *Pelargonium graveolens* L'Her., kao i glavnih komponenti ulja geraniola i citronelola je uočen sinergistički efekat sa norfloksacinom na laboratorijski soj *S. aureus* (Rosato i sar., 2007). Etarska ulja i antibiotici mogu delovati na različita ciljna mesta i tako ostvarivati kompleksni sinergistički efekat (Hemaiswarya i sar., 2008; Ma i sar., 2009).

Etarsko ulja korena devesilja ispoljilo je izraženu antibakterijsku aktivnost na rast laboratorijskog soja *Helicobacter pylori*, bakterije koja kolonizuje sluzokožu želuca.

Dugotrajna izloženost toksinima i enzimima, koje oslobađa *H. pylori*, oštećuje epitelne ćelije mukoze želuca i uzrokuje hronični gastritis, želudačni i duodenalni ulkus, a može dovesti i do razvoja gastričnog adenokarcinoma i gastričnog MALT limfoma. Lečenje infekcije se uspešno sprovodi primenom kombinovane terapije, primenom antibiotika i inhibitora protonске pumpe, ali primećena je i sve veća rezistencija bakterija na standardnu terapiju (Matysiak-Budnik i Mégraud, 2006; Wroblewski i sar., 2010; Ayala i sar., 2014). Ranija istraživanja su pokazala antimikrobno delovanje etarskog ulja vrste *Apium nodiflorum* (L.) Lag. (Menghini i sar., 2010) i etarskih ulja nadzemnih delova različitih vrsta roda *Thymus* L. na rast *H. pylori*. Ispitivanje intraćelijske antibakterijske aktivnosti etarskog ulja *T. caespititius* Brot. i karvakrola na ćelijama humanog gastričnog adenokarcinoma inokulisanog sa *H. pylori*, pokazalo je značajno smanjenje vijabilnosti bakterija i inhibiciju intraćelijskog rasta (Dandlen i sar., 2011).

Etarsko ulje korena, herbe i ploda devesilja iz dve populacije Brđanske klisure i Golupca pokazalo je citotoksičnu aktivnost na ćelijske linije humanog karcinoma grlića materice HeLa, humanog karcinoma kolona LS174, humanog karcinoma pluća A549 i ćelijskoj liniji humanih fetalnih plućnih fibroblasta MRC-5 ($IC_{50}=7,41-75,91 \mu\text{g/ml}$). Najbolje delovanje je ostvareno sa etarskim uljem korena ($7,41-30,32 \mu\text{g/ml}$). Njegova aktivnost je samo nešto slabija od aktivnosti kontrolnog citotoksičnog agensa cisplatina ($3,46-20,38 \mu\text{g/ml}$). Slično cisplatinu, ulje korena je delovalo citotoksično i na normalne ćelije humanih fetalnih plućnih fibroblasta (MRC-5). Etarska ulja u eukariotskim ćelijama mogu uzrokovati permeabilizaciju mitohondrijalne membrane, što dovodi do ćelijske smrti putem nekroze ili apoptoze (Bakkali i sar., 2008). Poliacetilen falkarinol je u ranijim ispitivanjima pokazao izraženo citotoksično delovanje na različite ćelijske linije, poput leukemijskih ćelija (L-1210), ćelija humanog gastričnog adenokarcinoma (MK-1), mišjeg melanoma (B-16) i transformisanih ćelija mišjih fibroblasta (L-929) (Christensen, 2011). Falkarinol i drugi poliacetileni su pokazali slične inhibitorne efekte na normalne (FHs 74 Int.) i tumorske (Caco-2) humane intestinalne epitelijalne ćelije (5 i $2,5 \mu\text{g/ml}$) (Purup i sar., 2009). Uprkos tome, da je etarsko ulje korena devesilja populacije iz Brđanske klisure sadržalo višu koncentraciju falkarinola (88,8%), nisu uočene razlike u citotoksičnom delovanju ulja korena devesilja iz različitih populacija. Ranije istraživanje je pokazalo da iako keton falkarinon deluje slabije citotoksično od falkarinola, njihova smeša ispoljava sinergistički efekat, koji zavisi od koncentracije i njihovih odnosa (Purup i sar., 2009; Christensen, 2011). Etarska ulje herbe ($IC_{50}=37,37-70,87 \mu\text{g/ml}$) i ploda ($36,21-62,61 \mu\text{g/ml}$) devesilja su pokazala umerenu citotoksičnu aktivnost. Citotoksična aktivnost terpena α -pinena zavisi od ispitivanih ćelijskih

linija. α -pinen inhibira nuklearnu translokaciju NF- κ B, koji reguliše ekspresiju gena odgovornih za apoptozu (Zhou i sar., 2004). α -pinen, sabinen i limonen deluju slabo citotoksično na ćelije humanog melanoma (C32) i humanog renalnog adenokarcinoma (ACHN) ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$), ali mogu ispoljiti sinergističko delovanje (Loizzo i sar., 2008).

Antioksidantna aktivnost etarskog ulja korena, herbe i ploda devesilja ispitivana putem određivanja ukupne redukcione sposobnosti ($0-0,38 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$) i određivanjem sposobnosti inhibicije DPPH radikala (SC_{50} $2,00-27,60 \text{ mg/ml}$) je bila niska. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim ispitivanjima, koja su pokazala nisku sposobnost inhibicije DPPH radikala etarskim uljem cveta devesilja ($24,5 \mu\text{l/ml}$) (Stojkovic i sar., 2009), kao i etarskim uljem ploda vrste *S. globiferum* (Stojković i sar., 2008).

Povećano stvaranje kiseoničnih radikala može biti posledica disbalansa ili patoloških poremećaja u organizmu, kao i delovanja različitih egzogenih faktora. Kiseonični radikali oštećuju sve ćelijske strukture i oksidativno oštećenje DNK je jedno od najčešćih oštećenja humane DNK, koje praktično menja njenu strukturu i izaziva genotoksične efekte (Azqueta i sar., 2009; Liao i sar., 2009). Etarsko ulje korena, herbe i ploda devesilja nije pokazalo genotoksično delovanje. Po literaturnim podacima nije neuobičajeno da etarska ulja deluju citotoksično, a da ne pokazuju mutagenu aktivnost (Gomes-Carneiro i sar., 2005; Aydın i sar., 2005; Bakkali i sar., 2008; Berić i sar., 2008). Međutim, etarsko ulja korena ($12,5-100 \mu\text{g/ml}$), herbe ($25-100 \mu\text{g/ml}$) i ploda devesilja ($25-100 \mu\text{g/ml}$) ispoljilo je antigenotoksičnu aktivnost. Nisu uočene statistički značajne razlike u antigenotoksičnom delovanju etarskog ulja devesilja obe ispitivane populacije. Sva ispitivana ulja pokazala su dozno zavisani efekat i sa sniženjem koncentracija etarskog ulja korena antigenotoksični efekat je bio veći. Navedeni rezultati su u skladu sa ranijim ispitivanjima, kada je uočeno, da falkarinol pokazuje bifazni efekat na proliferaciju, DNK oštećenja i apoptozu CaCo-2 ćelija kancera kolona, zavisno od primenjene koncentracije (Young i sar., 2007). Najbolje antigenotoksično delovanje ispoljila su etarska ulja herbe i ploda devesilja. Ispitivana etarska ulja devesilja nisu pokazala antigenotoksičnu aktivnost u pretretmanu, kada se aktivnost većinom ostvaruje putem stimulacije antioksidantnih enzima ili neutralizacije slobodnih radikala, što je u skladu sa niskom antioksidantnom aktivnošću. Etarska ulja su ostvarila antigenotoksično delovanje u post-tretmanu, kada se etarska ulja aplikuju nakon izazivanja DNK oštećenja i mehanizam njihovog delovanja je verovatno stimulacija DNK reparacije i bioantimutageni efekat (Nikolić i sar., 2011; Čabarkapa i sar., 2014).

Citirana literatura:

1. Aprotosoiaie AC, Şpac A, Hăncianu M, Miron A, Tănăsescu VF, Dorneanu V, Stănescu U. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia* 2010; 58: 46-53.
2. Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, Cruz-Herrera CF, Romero I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20(6): 1450-1469.
3. Aydın S, Başaran AA, Başaran N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutat Res* 2005; 581: 43-53.
4. Ayoub N, Al-Azizi M, König W, Kubeczka K.-H. Essential oils and a novel polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michaux. (Apiaceae). *Flavour Fragr J* 2006; 21: 864-868.
5. Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res* 2009; 674: 101-108.
6. Bader A, Caponi C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. Acorenone in the essential oil of flowering aerial parts of *Seseli tortuosum* L. *Flavour Fragr J* 2003; 18: 57-58.
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446-475.
8. Barrero AJ, Herrador MM, Arteaga P. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Seseli varyedanum*. *Phytochemistry* 1994; 37: 1351-1358.
9. Baser KHC, Özek T, Kürkçüoğlu M, Aytaç Z. Essential oil of *Seseli campestre* Besser, *JEOR* 2000; 12: 105-107.
10. Berić T, Nikolić B, Stanojević J, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 724-732.
11. Bulatović VM, Šavikin-Fodulović KP, Zdunić GM, Popović MP. Essential oil of *Seseli peucedanoides* (MB) Kos.-Pol. *JEOR* 2006; 18: 286-287.
12. Capetanios C, Saroglou V, Marin PD, Simić A, Skaltsa HD. Essential oil analysis of two endemic *Eryngium* species from Sebia. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2007; 72, 961-965.
13. Christensen LP. Aliphatic C17-Polyacetylenes of the Falcarinol Type as Potential Health Promoting Compounds in Food Plants of the Apiaceae Family. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2011; 3: 64-77.
14. Čabarkapa A, Živković L, Žukovec D, Djelić N, Bajić V, Dekanski D, Spremo-Potparević B. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicol In Vitro* 2014; 28: 451-456.
15. Dandlen SA, Lima AS, Mendes MD, Miguel MG, Faleiro ML, Sousa MJ, Pedro LG, Barroso JG, Figueiredo AC. Antimicrobial activity, cytotoxicity and intracellular growth inhibition of Portuguese *Thymus* essential oils. *Rev. Bras. Farmacogn. (Braz. J. Pharmacogn.)* 2011; 21(6): 1012-1024.
16. Dogan E, Duman H, Tosun A, Kürkçüoğlu M, Baser KHC. Essential oil composition of the fruits of *Seseli resinosum* Freyn et Sint. and *Seseli tortuosum* L. growing in Turkey. *JEOR* 2006; 18: 57-59.
17. Dudić B, Rakić T, Šinžar-Sekulić J, Atanacković V, Stevanović B. Differences of metal concentrations and morpho-anatomical adaptations between obligate and facultative serpentinophytes from western Serbia. *Arch. Biol. Sci.* 2007; 59: 341-349.
18. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 2008; 23: 213-226.
19. Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Maccioni S, Baldini R. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). *Food Chem* 2004; 85: 599-604
20. Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygodlo J, Demo M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molecular Medicinal Chemistry* 2006; 10: 30-32.
21. Garau J, Bouza E, Chastre J, Gudiol F, Harbarth S. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 125-136.
22. Gibbons S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med* 2008; 74: 594-602.
23. Gomes-Carneiro MR, Viana MES, Felzenszwalb I, Paumgarten FJR. Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+)- and (-)- α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 247-252.
24. Gonçalves MJ, Tavares AC, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro L. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*

- (Samp.) M. Láinz from Portugal. *Ind Crops Prod* 2012; 39: 204-209.
25. Habibi Z, Masoudi S, Rustaiyan A. Chemical composition of the essential oil of *Seseli tortuosum* L. ssp. *kiabii* Akhani. from Iran. *JEOR* 2003; 15: 412-413.
 26. Hamilton JG, Zangerl AR, DeLucia EH, Berenbaum MR. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecol Lett* 2001; 4: 86-95.
 27. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; 15: 639-652.
 28. Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 2009; 16: 997-1005
 29. Jabrane A, Jannet HB, Harzallah-Skhiri F, Mastouric M, Casanova J, Z. Mighri Z. Flower and root oils of the tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): integrated analyses by GC, GC/MS, and ¹³C-NMR spectroscopy, and in vitro antibacterial activity. *Chem Biodivers.* 2009; 6: 881-889.
 30. Janačković P, Soković M, Vujisić L, Vajs V, Vučković I, Krivošej Z, Marin PD Composition and antimicrobial activity of *Seseli globiferum* essential oil. *Nat Prod Commun* 2011; 6 (8): 1163-1166.
 31. Kaya, A., Demirci, B., Başer, K.H.C. The essential oil of *Seseli tortuosum* L. growing in Turkey. *Flavour Fragr J* 2003; 18: 159-161.
 32. Kaya A, Demirci B, Başer KHC. Composition of the essential oil of *Seseli campestre* Besser. growing in the Northwest Anatolia. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 7: 161-166.
 33. Kobaisy M, Abramowski Z, Lermer L, Saxena G, Hancock REW, Towers GHN. Antimycobacterial polyynes of devil's club (*Oplopanax horridus*), a North American native medicinal plant. *J Nat Prod* 1997; 60: 1210-1213.
 34. Kuznjecova GA, Ševarda AL, Pavlović S, Jančić R. Količina i kvalitativni sastav etarskog ulja raznih delova devesilja – *Seseli rigidum* Waldst et Kit. iz klisura reke Grze, Jerme i Despotovice. *Arh Farm (Belgr)* 1982; 5: 291-299.
 35. Lakušić D, Ristić M, Slavkovska V, Šinžar-Sekulić J, Lakušić B. Environmental-related Variations of the Composition of the Essential oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from the Balkan Peninsula. *Chem. Biodivers.* 2012; 9: 1286-1302.
 36. Liao W, McNutt MA, Zhu W-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009; 48: 46-53.
 37. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prolif.* 2008; 41 (6): 1002-1012.
 38. Ma XH, Zheng CJ, Han LY, Xie B, Jia J, Cao ZW, Li YX, Chen YZ. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. *Drug Discov Today* 2009; 14: 579-588.
 39. Maggi F, Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy). *Fitoterapia* 2009; 80: 68-72.
 40. Marčetić M, Petrović S, Milenković M, Vujisić Lj, Tešević V, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of root essential oil of Balkan endemic species *Eryngium palmatum* Pancic & Vis. *Chemistry of Natural Compounds* 2014; 49 (6): 1140-1142.
 41. Matysiak-Budnik T, Mégraud F. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Eur. J. Cancer* 2006; 42: 708-716.
 42. Menghini L, Leporini L, Tirillini B, Epifano F, Genovese S. Chemical composition and inhibitory activity against *Helicobacter pylori* of the essential oil of *Apium nodiflorum* (Apiaceae). *J Med Food* 2010; 13: 228-230
 43. Milosavljević S, Tešević V, Vučković I, Jadranin M, Vajs V, Soković M, Janačković P, Jovanović A. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia. *Fitoterapia* 2007; 78: 319-322.
 44. Nikolić B, Mitić-Čulafić D, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 2035-2045.
 45. Ormeño E, Bousquet-Melou A, Mévy JP, Greff S, Robles C, Bonin G, Fernandez C. Effect of intraspecific competition and substrate type on terpene emissions of some Mediterranean species. *J. Chem. Ecol.* 2007; 33:277-286.

46. Ormeño E, Baldy V, Ballini C, Fernandez C. Production and Diversity of Volatile Terpenes from Plants on Calcareous and Siliceous Soils: Effect of Soil Nutrients. *J. Chem. Ecol.* 2008; 34: 1219–1229.
47. Ozturk S, Ercisli S. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Seseli libanotis*. *World J Microbiol Biotechnol* 2006; 22, 261-265.
48. Purup S, Larsen E, Christensen LP. Differential effects of falcarinol and related aliphatic C17-polyacetylenes on intestinal cell proliferation. *J Agric Food Chem* 2009; 57(18): 8290-8296.
49. Ramezani S, Rasouli F, Solaimani B. Changes in essential oil content of coriander (*C. sativum* L.) aerial parts during four phenological stages in Iran. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 2009; 12, 683–689.
50. Robles C, Garzino S. Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry* 1998; 48: 1341-1345.
51. Robles C, Garzino S. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry* 2000; 53: 71-75.
52. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Milillo MA. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin *Phytomedicine* 2007; 14: 727–732
53. Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfine S, Cardile V, Rosselli S, Bruno M. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 42–47.
54. Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul* 2001; 34(1): 3-21.
55. Schinkovitz A, Stavri M, Gibbons S, Bucar F. Antimycobacterial polyacetylenes from *Levisticum officinale*. *Phytother Res* 2008; 22(5): 681-684.
56. Singh G, Kapoor IPS, Pandey SK, Singh UK, Singh RK. Studies on Essential Oils: Part 10; Antibacterial Activity of Volatile Oils of Some Spices. *Phytother. Res.* 2002; 16: 680–682.
57. Skalicka-Wozniak K, Los R, Glowniak K, Malm A. Comparison of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction techniques for antibacterial volatile compounds from the fruits of *Seseli libanotis*. *Nat Prod Commun* 2010; 5: 1427-1430.
58. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, Daum RS, Dryden M, Huang Y-C, Lowy FD. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 193-200.
59. Stojković D, Glamočlija J, Soković M, Grubišić D, Petrović S, Kukić J, Ristić M. Chemical composition, antimicrobial and antiradical properties of the essential oils of *Seseli globiferum* fruits. *Nat Prod Commun* 2008; 3: 1935-1938.
60. Stojkovic S, Petrovic S, Kukic J, Dzamic A, Ristic M, Milenkovic M, Glamoclija J, Sokovic M, Stojkovic D. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Seseli rigidum* flower essential oil. *Chemistry of Natural Compounds* 2009; 45: 253-256.
61. Šavikin-Fodulović KP, Zdunić GM, Tasić SR. Essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. et Kit. var. *rigidum*. *JEOR* 2006; 18: 156-157.
62. Šiljegović J, Glamočlija J, Soković M, Vučković I, Tešević V, Milosavljević S, Stešević D. Composition and antimicrobial activity of *Seseli montanum* subsp. *tommasinii* essential oil. *Nat Prod Commun* 2011; 6: 263-266.
63. Telci I, Demirtas I, Sahin A. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind Crops Prod* 2009; 30: 126–130
64. Tkachev AV, Korolyuk EA, König W, Kuleshova YV, Letchamo W. Chemical screening of volatile oil-bearing flora of Siberia VIII.: Variations in chemical composition of the essential oil of wild growing *Seseli buchtormense* (Fisch. ex Sprengel) W. Koch from different altitudes of Altai Region. *JEOR* 2006; 18: 100-103.
65. Tosun A, Özkal N, Yildiz S. Antimicrobial activity screening of some *Seseli* L. species growing in Turkey. *J. Fac. Pharm, Ankara* 2004; 33 (3): 151-155.
66. Tosun A, Kürküoğlu M, Dogan E, Duman H, Başer KHC. Essential oil composition of *Seseli petraeum* M. Bieb. and *Seseli andronakii* Woron. growing in Turkey. *Flavour Fragr J* 2006; 21: 257-259.
67. Usano-Aleman J, Palá-Paúl J, Herráiz-Peñalver D. Temperature stress causes different profiles of volatile compounds in two chemotypes of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Biochem Syst Ecol* 2014; 54: 166–171.
68. Vučković I, Vajs V, Stanković M, Tešević V, Milosavljević S. A new prenylated flavanonol from *Seseli annuum* roots showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Chem Biodivers.* 2010; 7: 698-704.
69. Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 2011; 82: 34–

- 37.
70. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. Clin. Microbiol. Rev. 2010; 23(4):713-739.
71. Young JF, Duthie SJ, Milne L, Christensen LP, Duthie GG, Bestwick CS. Biphasic effect of falcarinol on CaCo-2 cell proliferation, DNA damage, and apoptosis. J Agric Food Chem 2007; 55(3): 618-623.
72. Zhou JY, Tang FD, Mao GG, Bian RL. Effect of α -pinene on nuclear translocation of NF- κ B in THP-1 cells. Acta Pharmacol Sin 2004; 25 (4): 480-484.
73. Zong YL, Lin YP, Ding QE, He H, Rao GX. Studies on the chemical constituents of the aerial parts of *Seseli mairei*. Zhong Yao Cai 2007; 30: 42-44.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

1. **Marčetić M**, Božić D, Milenković M, Lakušić B, Kovačević N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Different Parts of *Seseli rigidum*. Natural Product Communications, (2012), vol. 7 br. 8, str. 1091-1094. (M23)
2. **Marčetić M**, Lakušić B, Lakušić D, Kovačević N. Variability of the Root Essential Oils of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) from Different Populations in Serbia. Chemistry & Biodiversity, (2013), vol. 10 br. 9, str. 1653-1666. (M22)
3. Kovačević N, **Marčetić M**, Lakušić D, Lakušić B Composition of the Essential Oils of Different Parts of *Seseli annuum* L. (Apiaceae). Journal of Essential Oil Bearing Plants, (2014) ID:901604 DOI: 10.1080/0972060X.2014.901604 (M23)

5. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**Varijabilnost sastava i biološka aktivnost etarskog ulja vrste *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae)**“, kandidata mr sc. Mirjane Marčetić poseduje sve odlike naučnoistraživačkog rada. Kroz terenski rad i laboratorijski ekperimentalni rad, prikupljeni su podaci, obrađeni odgovarajućim statističkim metodama, što je, sve zajedno, omogućilo izvođenje odgovarajućih zaključaka. Dobijeni podaci i izvedeni zaključci su upoređeni sa podacima iz literature, a vezano za slična istraživanja urađena sa drugim biljnim vrstama. Sve urađeno omogućilo je kandidatu da sagleda i

relevantno tumači određene prirodne fenomene vezane za određenu biljnu vrstu *S. rigidum*.

Analiza 206 individualnih uzoraka biljaka potvrdila je da su etarska ulja korena, herbe i ploda biljne vrste *S. rigidum* međusobno jasno diferencirana. Primenom analize glavnih komponenti (PCA) na sve uzorke etarskog ulja izolovane iz određenog organa, utvrđeno je da klima ima značajan uticaj na sastav etarskog ulja korena i herbe, dok na sastav etarskog ulja ploda, pre svega, utiče tip podloge (serpentinita vs. krečnjak). Diskriminantna analiza (CDA) je, takođe, potvrdila jasno definisan sastav etarskog ulja korena, herbe i ploda vrste *S. rigidum*. Dodatno, ova analiza je ukazala i na značajnu diferenciranost ulja devesilja iz zapadne Srbije, u odnosu na ulja iz istočne Srbije. Takođe, i CDA analiza je potvrdila da klimatske prilike (vlažna vs. polusuva klima) imaju veći značaj na varijabilnost etarskog ulja devesilja, u odnosu na geološku podlogu ili pripadnost individua određenoj populaciji.

Do sada ova biljna vrsta nije bila proučena na ovakav način, a varijabilnost etarskog ulja nije bile tako jasno i detaljno dokumentovana.

Drugi deo ispitivanja, odnosio se na skrining odabranih bioloških aktivnosti etarskog ulja *S. rigidum*. Do sada etarsko ulje ove biljne vrste nije bilo predmet detaljnog ispitivanja. Kandidat je ukazao da etarsko ulje različitih biljnih organa, a naročito etarsko ulje korena pokazuje antimikrobnu aktivnost na različite laboratorijske sojeve bakterija. S druge strane, utvrđeno je da etarsko ulje korena inhibira rast MRSA sojeva i Gram negativne bakterije *Helicobacter pylori*. Takođe, etarsko ulje korena je delovalo sinergistički sa tri ispitivana antibiotika na rast izolovanih MRSA sojeva. Etarsko ulje korena, herbe i ploda devesilja delovalo je citotoksično na ispitivane ćelijske linije i izražena aktivnost je uočena primenom etarskog ulja korena. Utvrđeno je da ispitivana etarska ulja ne deluju genotoksično, već da ispoljavaju antigenotoksičnu aktivnost.

Svi ovi rezultati su novi i do sada nisu prezentovani za ispitivanu biljnu vrstu pa, samim tim, imaju značajnu naučnu vrednost. Takođe, rezultati istraživanja u okviru ove disertacije ukazali su na mogućnost i opravdanost nastavka istraživanja u ovoj i srodnim naučnim disciplinama, a zbog potencijalne mogućnosti primene ispitivane biljne vrste *S. rigidum*.

Rezultati koji predstavljaju deo ove doktorske disertacije prezentovani su naučnoj javnosti kroz izlaganja na naučnim skupovima i publikacije; publikovana su 2 rada u

časopisima međunarodnog značaja kategorije M22 i M23, a jedan rad je prihvaćen za publikovanje u časopisu M23.

Važno je napomenuti da ova disertacija, od same postavke problema, sagledavanja i procene njegove naučne zasnovanosti, organizacije istraživanja, odabira odgovarajuće metodologije, realizacije eksperimenata, obrade podataka, njihove prezentacije i tumačenja, poređenja sa dostupnim podacima i kritičkim osvrtom na njihovu relevantnost, predstavlja samostalan naučno istraživački rad Mr sc. Mirjane Marčetić.

Koleginica Marčetić je, i radom u okviru doktorske disertaciji, potvrdila da je kompetentan istraživač, sposoban da samostalno, ali i kroz timski rad, definiše odgovarajući naučni problem, odabere i primeni odgovarajuću, savremenu metodologiju koja može obezbediti relevantne i tačne podatke i kritički proceni njihovu naučnu značajnost i vrednost.

6. PREDLOG

Na osnovu svega izloženog, Komisija sa velikim zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „**Varijabilnost sastava i biološka aktivnost etarskog ulja vrste *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae)**“ i kandidatu mr sc. Mirjani Marčetić odobri javnu odbranu po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Članovi Komisije:

Dr sc. Nada Kovačević, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Branislava Lakušić, vanredni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Dmitar Lakušić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr sc. Zoran Todorović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Marina Milenković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Beograd, 4. 07. 2014. god.